

09/856327

REC'D 15 NOV 2000

WIPO PCT

T/JP00/06404

4 日本国特許庁

20.09.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/6404

p#8

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 9月21日

RECEIVED

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第267238号

JUN 03 2002

TECH CENTER 1600/2000

出願人

Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社
社団法人農林水産先端技術産業振興センター

PRIORITY
DOCUMENT

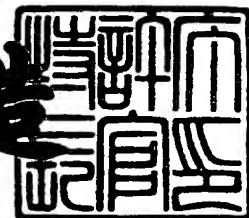
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2000年10月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3087566

【書類名】 特許願
【整理番号】 991703
【提出日】 平成11年 9月21日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内
【氏名】 高倉 由光

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内
【氏名】 桑田 茂

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内
【氏名】 井上 康宏

【特許出願人】

【識別番号】 000004569
【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 593027587
【氏名又は名称】 社団法人農林水産先端技術産業振興センター

【代理人】

【識別番号】 100089705
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2 0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所
【弁理士】
【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠式

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100107386

【弁理士】

【氏名又は名称】 泉谷 玲子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814816

特平 1 1 - 2 6 7 2 3 8

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規タンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらの利用
法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ホンシメジの水性抽出液から硫酸沈殿法で沈殿する画分から得ることができ、
少なくともイネ紋枯病菌またはイネイモチ病菌に対する抗菌活性を有し、SDS
-PAGE法で分子量が約70 kDaおよび/または約65 kDaの成分の存在
を示す、抗菌タンパク質。

【請求項 2】

N末端が、配列表の配列番号3に記載のN末端アミノ酸配列：Asn Ala Glu Gl
u Gly Thr Ala Val Pro Tyr Val Pro Gly Tyr His Lys Lys Asn Glu Ile Glu Ph
e Gln Lys Asp Ile Asp Arg Phe Valを有する、請求項1に記載の抗菌タンパク
質。

【請求項 3】

配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列、あるいはこの配列中に1から複数
個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列若しくはこの配列と50%以上の相同性
を有するアミノ酸配列を有し、イネ紋枯病菌またはイネイモチ病菌に対する抗菌
活性を示す抗菌タンパク質。

【請求項 4】

配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミ
ノ酸配列を有する請求項3に記載の抗菌タンパク質。

【請求項 5】

配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミ
ノ酸配列を有する請求項3に記載の抗菌タンパク質。

【請求項 6】

配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミ
ノ酸配列を有する請求項3に記載の抗菌タンパク質。

【請求項 7】

配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する請求項 3 に記載の抗菌タンパク質。

【請求項 8】

配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する請求項 3 に記載の抗菌タンパク質。

【請求項 9】

配列表の配列番号 2 の部分アミノ酸配列 7 6 - 6 1 8 からなるポリペプチド、並びに上記アミノ酸配列の何れかの中に 1 ~ 複数個のアミノ酸変異を有するポリペプチドおよび上記アミノ酸配列の何れかと 5 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであってイネ紋枯病菌またはイネイモチ病菌に対する抗菌活性を示す当該ポリペプチド、の単独又は何れかのポリペプチドの組み合わせから成る抗菌タンパク質。

【請求項 1 0】

ホンシメジの水性抽出液から硫酸 7 5 % 飽和を使用する硫酸沈殿法で沈殿する画分を回収する工程；および

上記画分をイオン交換クロマトグラフィーにかけ N a C l 濃度 0 . 0 5 M から 1 M の濃度で溶出する画分を回収する工程；

を含む、請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の抗菌タンパク質の製造方法。

【請求項 1 1】

請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の抗菌タンパク質をコードする遺伝子

。

【請求項 1 2】

配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列、上記塩基配列中に 1 ~ 複数個の塩基の置換、欠失、挿入及び／又は付加を有する塩基配列、または上記塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する請求項 1 1 に記載の遺伝子。

【請求項 1 3】

配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列と 5 0 % 以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項 1 1 又は 1 2 に記載の遺伝子。

【請求項 1 4】

配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列と 6 0 % 以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項 1 1 又は 1 2 に記載の遺伝子。

【請求項 1 5】

配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列と 7 0 % 以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項 1 1 又は 1 2 に記載の遺伝子。

【請求項 1 6】

配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列と 8 0 % 以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項 1 1 又は 1 2 に記載の遺伝子。

【請求項 1 7】

配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列と 9 0 % 以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項 1 1 又は 1 2 に記載の遺伝子。

【請求項 1 8】

配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列と 9 5 % 以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項 1 1 又は 1 2 に記載の遺伝子。

【請求項 1 9】

ホンシメジ由来の抗菌タンパク質をコードする遺伝子を得るためのオリゴヌクレオチドであって、

配列表の配列番号 1 に示す抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列から以下の条件を満たすように 2 つの領域を選択し：

- 1) 各領域の長さが 1 5 - 3 0 塩基であること；
- 2) 各領域中の G + C の割合が 4 0 - 6 0 % であること；

上記領域と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖 DNA を製造し、または、上記一本鎖 DNA によってコードされるアミノ酸残基を変化させないように遺伝子暗号の縮重を考慮した一本鎖 DNA の混合物を製造し、さらに必要であれば上記抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖 DNA を製造することを含む方法により製造された当該オリゴヌクレオチド。

【請求項 2 0】

配列表の配列番号 7 ないし 1 2 の何れかに記載のヌクレオチド配列を有する請求項 1 9 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 2 1】

請求項 1 9 又は 2 0 に記載のオリゴヌクレオチドの 2 種をプライマー対として用いて、ホンシメジ子実体 c DNA ライブラリーを鋳型にして核酸増幅反応を行い請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の抗菌タンパク質をコードする遺伝子の一部を増幅し、得られた増幅産物をプローブとして使用して上記 c DNA ライブラリーをスクリーニングして完全長 c DNA クローンを単離することを含む、請求項 1 1 ないし 1 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子の単離方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 1 ないし 1 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 2 3】

ベクターが発現ベクターである請求項 2 2 に記載の組換えベクター。

【請求項 2 4】

宿主生物に請求項 2 2 または 2 3 に記載の組換えベクターを導入して得られる形質転換体。

【請求項 2 5】

請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の抗菌タンパク質を有効成分として含む抗菌剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗菌活性を有する新規なタンパク質、上記タンパク質をコードする遺伝子、並びに上記タンパク質および上記遺伝子の利用法に関する。さらに詳細には、本発明は、少なくともイネ紋枯病菌およびイネイモチ病菌に対する抗菌活性を有するホンシメジ由来タンパク質、上記タンパク質をコードする遺伝子、並びに上記タンパク質および上記遺伝子の利用法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

植物病原菌に対して抗真菌活性あるいは抗菌活性を有する植物のタンパク質としては、キチナーゼ、 β -1, 3-グルカナーゼなどの溶菌酵素が従来から知られている。In vitro 実験では、これらの酵素は単独でも効果があるが (Schlumbaum 他 (1986), Nature 324, p. 365-367; Broglie 他 (1991), Science 254, p. 1194-1197)、一般には2種類以上の酵素を組み合わせる使用することにより、より高い効果が得られることが知られている (Mauch 他 (1988), Plant Physiol. 88, p. 936-942; Sela-Buurlage 他 (1993), Plant Physiol. 101, p. 857-863)。これら溶菌酵素が糸状菌の生育を抑制する濃度は一般的には、単独の場合で数十～数百 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度、組み合わせの場合でも各々の酵素当たり数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度を必要とすることが知られている。しかしながら、これらの溶菌酵素の中で、イネの重要病害であるイモチ病菌 (Pyricularia oryzae) に対して抗菌的に働くことが証明されたものは本発明者が知る範囲では未だ報告されていない。

【0003】

一方、ディフェンシンをはじめとする小分子量AFP (抗真菌ペプチド; Anti-fungal peptide) も抗微生物活性を有する。このうちイネのイモチ病菌 (Pyricularia oryzae) と紋枯病菌 (Rhizoctonia solani) の両方に対して抗菌的に働くものとしては、Ca-AMP1 (特表平8-505048) 及びCB-1 (Oita 他 (1996), Biosci. Biotech. Biochem. 60, p. 481-483) が、イモチ病菌 (Pyricularia oryzae) に対して抗菌活性があるものとして、Rs-AFP1とRs-AFP2 (Terras 他 (1992), J. Biol. Chem. 267, p. 15301-15309)、及びAce-AMP1 (特表平9-501424) が報告されている。これらの低分子ペプチドは数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度で上記病原菌を含む各種の植物病原菌の生育を50%阻害する。

【0004】

溶菌酵素あるいは低分子量抗菌ペプチドの遺伝子を単離して、植物に導入し、病害抵抗性植物を作出しようという試みもなされている (Broglie 他 (1991), Science 254, p. 1194-1197; Zhu 他 (1994), Bio/Technology 12, p. 807-812; Lin 他, (1995), Bio/Technology 13, p. 686-691; Terras 他 (1995), The Plant Cell 7, p. 573-588)。しかし、現状では、必ずしも実用化レベルの抵抗性を付与された植物体を得られていないことが多い。この理由としては、導入した遺伝子の発現レベルが低いことがあげられるが、より本質的には、これまでに報告されている抗菌タンパク質自体の抗菌力が低いことによるものと考えられる。従って、従来の抗菌タンパク質よりさらに強力な抗菌タンパク質を同定して利用を図ることが望まれている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的の1つは、比較的低濃度でイネの2大病害であるイモチ病菌と紋枯病菌をはじめとする様々な植物病原菌の生長を抑止できる新規な抗菌タンパク質を検索、同定することである。

【0006】

本発明の別の目的は、上記の新規タンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、その塩基配列を特定することである。

本発明のさらに別の目的は、本発明の遺伝子を宿主生物（微生物、動物または植物など）に導入して形質転換体を作成し、本発明の遺伝子の利用を図ることである。

【0007】

本発明のさらに別の目的は、本発明の抗菌タンパク質を含む抗菌剤を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決することを目的として、本発明者らは、先ず、イモチ病菌および紋枯病菌に対する *in vitro* での抗菌活性を検定するためのアッセイ系を確立した。次いで、本発明者らは、食用キノコ的一种であるホンシメジからタンパク質を抽出し、イオン交換カラムクロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を組み合わせ、各画分を上記アッセイ系に供試することにより、抗菌タンパク質画分を同定し、抗菌タンパク質を単離・精製することに成功した。さらに本発明者らは、精製タンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、このアミノ酸配列に基づき合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用する RT-PCR 法により当該タンパク質をコードする部分長 cDNA を得た。次いで、本発明者らは、この部分長 cDNA をプローブとして用いてホンシメジ由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、当該タンパク質をコードする完全長の cDNA を単離し、全塩基配列を決定した。上記の通り、本発明者らは、ホンシメジ由来の新規な抗菌タンパク質の単離とそれをコードする DNA のクローニングに成功し、また当該タンパク質のアミノ酸配列と当該 DNA の塩基配列を決定して本発明を完成するに至った。

【0009】

即ち、本発明の第1の側面によれば、ホンシメジの水性抽出液から硫酸沈殿法で沈殿する画分から得ることができ、少なくともイネ紋枯病菌またはイネイモチ病菌に対する抗菌活性を有し、SDS-PAGE法で分子量が前駆体型で約70 kDa、そして成熟型で約65 kDaである、抗菌タンパク質が提供される。

【0010】

本発明の抗菌タンパク質は、典型的には、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する。限定されるわけではないが、約65 kDaの成熟型は、配列番号1のアミノ酸残基76-618からなると推測される。

【0011】

本発明の抗菌タンパク質は、配列番号2に記載のアミノ酸配列のみでなく、当該配列において1から複数個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列若しくはこの配列と50%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、イネ紋枯病菌またはイネイモチ病菌に対する抗菌活性を示す抗菌タンパク質も含む。

【 0 0 1 2 】

本発明の抗菌タンパク質は、好ましくは、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と 6 0 % 以上、より好ましくは 7 0 % 以上、さらに好ましくは 8 0 % 以上、特に好ましくは 9 0 % 以上、最も好ましくは 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する。

【 0 0 1 3 】

本発明の第 2 の側面によれば、配列表の配列番号 2 の部分アミノ酸配列、例えばアミノ酸残基 7 6 - 6 1 8、からなるポリペプチド；並びに上記アミノ酸配列の何れかの中に 1 ～複数個のアミノ酸変異を有するポリペプチドおよび上記アミノ酸配列の何れかと 5 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、イネ紋枯病菌またはイネイモチ病菌に対する抗菌活性を示す当該ポリペプチド；の単独又は何れかのポリペプチドの組み合わせから成る抗菌タンパク質が提供される。

【 0 0 1 4 】

本発明の第 2 の側面による上記抗菌タンパク質に関して、各々の具体的アミノ酸配列と「5 0 % 以上の相同性を有するタンパク質」という定義は、少なくとも 5 0 % 以上の相同性を有していればよいことを意味するが、好ましくは 6 0 % 以上、より好ましくは 7 0 % 以上、さらに好ましくは 8 0 % 以上、特に好ましくは 9 0 % 以上、最も好ましくは 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質が意図される。

【 0 0 1 5 】

本発明の第 3 の側面によれば、ホンシメジの水性抽出液から硫酸 7 5 % 飽和を使用する硫酸沈殿法で沈殿する画分を回収する工程；および

上記画分をイオン交換クロマトグラフィーにかけ N a C l 濃度 0 . 0 5 M から 1 M の濃度で溶出する画分を回収する工程；

を含む、本発明の抗菌タンパク質の製造方法が提供される。

【 0 0 1 6 】

本発明の第 4 の側面によれば、本発明の抗菌タンパク質をコードする遺伝子が提供される。

本発明の遺伝子は、典型的には、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列、上記塩基配列中に 1 ～複数個の塩基の置換、欠失、挿入及び／又は付加を有する塩基配列、または上記塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する。

【0017】

本発明の遺伝子は、一般的には、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列と 50 %以上、好ましくは 60 %以上、より好ましくは 70 %以上、さらに好ましくは 80 %以上、特に好ましくは 90 %以上、最も好ましくは 95 %以上の相同性を有する塩基配列を有する。

【0018】

本発明の第 5 の側面によれば、ホンシメジ由来の抗菌タンパク質を得るためのオリゴヌクレオチドであって、

配列表の配列番号 1 に示す抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列から以下の条件を満たすように 2 つの領域を選択し：

- 1) 各領域の長さが 15 - 30 塩基であること；
- 2) 各領域中の G + C の割合が 40 - 60 %であること；

上記領域と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖 DNA を製造し、または、上記一本鎖 DNA によってコードされるアミノ酸残基を変化させないように遺伝子暗号の縮重を考慮した一本鎖 DNA の混合物を製造し、さらに必要であれば上記抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖 DNA を製造することを含む方法により製造された当該オリゴヌクレオチドが提供される。

【0019】

本発明のオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列表の配列番号 7 ないし 12 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列を有する。

本発明の第 6 の側面によれば、上記オリゴヌクレオチドの 2 種の組をプライマーとして用いて、ホンシメジ cDNA ライブラリーを鋳型にして増幅反応を行い本発明の抗菌タンパク質をコードする遺伝子の一部を増幅し、得られた増幅産物をプローブとして使用して上記 cDNA ライブラリーをスクリーニングして完全

長 cDNA クローンを単離することを含む、本発明の遺伝子の単離方法が提供される。

【0020】

本発明の第 7 の側面によれば、本発明の遺伝子を含む組換えベクターが提供される。

本発明の組換えベクターにおいて、好ましくは、ベクターは発現ベクターである。

【0021】

本発明の第 8 の側面によれば、宿主生物に本発明の組換えベクターを導入して得られる形質転換体が提供される。

本発明の第 9 の側面によれば、本発明の抗菌タンパク質を有効成分として含む抗菌剤が提供される。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の説明のために、好ましい実施形態に関して詳述する。

本発明の第一の側面によれば、植物病原菌に対して抗菌効果のあるホンシメジ由来のタンパク質が提供される。本発明のタンパク質は本明細書に記載した特徴を有する限り、その起源、製法などは限定されない。即ち、本発明の抗菌タンパク質は、天然産のタンパク質、遺伝子工学的手法により組換え DNA から発現させたタンパク質、あるいは化学合成タンパク質の何れでもよい。

【0023】

本発明のタンパク質は典型的には、配列表の配列番号 2 に記載の 618 個のアミノ酸配列を有する。しかし、天然のタンパク質の中にはそれを生産する生物種の品種の違いや、生態型 (ecotype) の違いによる遺伝子の変異、あるいはよく似たアイソザイムの存在などに起因して 1 から複数個のアミノ酸変異を有する変異タンパク質が存在することは周知である。なお、本明細書で使用する用語「アミノ酸変異」とは、1 以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加などを意味する。本発明のタンパク質は、クローニングされた遺伝子の塩基配列からの推測に基づいて、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するが、その配

列を有するタンパク質のみに限定されるわけではなく、本明細書中に記載した特性を有する限り全ての相同タンパク質を含むことが意図される。相同性は少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上である。

【0024】

本明細書において、相同性のパーセントは、例えばAltschulら (Nucleic Acids Res. 25., p. 3389-3402, 1997) に記載されているBLASTプログラムを用いて配列情報と比較し決定することが可能である。当該プログラムは、インターネット上でNational Center for Biotechnology Information (NCBI)、あるいはDNA Data Bank of Japan (DDBJ) のウェブサイトから利用することが可能である。BLASTプログラムによる相同性検索の各種条件（パラメーター）は同サイトに詳しく記載されており、一部の設定を適宜変更することが可能であるが、検索は通常デフォルト値を用いて行う。

【0025】

一般的に、同様の性質を有するアミノ酸同士の置換（例えば、ある疎水性アミノ酸から別の疎水性アミノ酸への置換、ある親水性アミノ酸から別の親水性アミノ酸への置換、ある酸性アミノ酸から別の酸性アミノ酸への置換、あるいはある塩基性アミノ酸から別の塩基性アミノ酸への置換）を導入した場合、得られる変異タンパク質は元のタンパク質と同様の性質を有することが多い。遺伝子組換え技術を使用して、このような所望の変異を有する組換えタンパク質を作製する手法は当業者に周知であり、このような変異タンパク質も本発明の範囲に含まれる。

【0026】

本発明のタンパク質は、SDS-PAGEで分子量が前駆体型（配列表の配列番号2の配列のうち第1番目から第618番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドに相当）が約70kDa、そして成熟型（配列表の配列番号2の配列のうち

第 7 6 番目から第 6 1 8 番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドに相当) が約 6 5 k D a である。限定されるわけではないが、本発明の抗菌タンパク質は、典型的には、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 2 7 】

従って、本発明によれば、配列表の配列番号 2 の第 1 番目から第 6 1 8 番目のアミノ酸配列からなるポリペプチド；および第 7 6 番目から第 6 1 8 番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドの単独又は何れかの組み合わせから成る抗菌タンパク質が提供される。なお、上記ポリペプチドには、本明細書中上記したような変異を有する相同なポリペプチドも含まれる。

【 0 0 2 8 】

本発明のタンパク質は、例えば後述の実施例に従ってホンシメジ子実体から硫酸沈殿法およびイオン交換カラムクロマトグラフィー等を用いて精製することができる。あるいは、本発明による配列表の配列番号 1 の DNA 配列のうち、第 8 番目から第 1 8 6 1 番目の配列から成る DNA 配列、または第 2 3 3 番目から第 1 8 6 1 番目の配列から成る DNA 配列を、大腸菌や酵母あるいは昆虫やある種の動物細胞に、それぞれの宿主で増幅可能な発現ベクターを用いて導入、発現させることにより、当該タンパク質を大量に得ることができる。

【 0 0 2 9 】

本発明のホンシメジ由来抗菌タンパク質について、D D B J の B L A S T による相同性検索を行うと、最も相同性の高いものでアミノ酸配列全体同士で 4 5 % の相同性しか有しておらず、これ以外で相同性のある配列は存在していないことから、本タンパク質は新規なタンパク質であると考えられる。本発明によってこのタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする DNA 配列が開示されれば、当該配列またはその一部を利用して、ハイブリダイゼーション、P C R 等の核酸増幅反応などの遺伝子工学的手法を用いて、他の生物種から同様の生理活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を容易に単離することができる。このような場合、それらの遺伝子がコードする新規タンパク質も本発明の範囲に含まれる。上述の B L A S T プログラムを用いて本発明の DNA 配列の相同性検索を行うと、非常に短い範囲 (3 2 塩基) で相同性 (9 3 %) を有するものがヒットする

のみである。

【0030】

本発明のホンシメジ由来の抗菌タンパク質が最も高い相同性（アミノ酸配列全体同士で45%）を有していたのは、カワラタケ（*Coriolus versicolor*）のピラノースオキシダーゼであった。ピラノースオキシダーゼは、グルコースを始めとするピラノース類を酸化し、2-ケト産物を過酸化水素を生成させる酵素で、他のピラノースの測定への応用価値が述べられている。本明細書に援用される特開平8-205861参照。本発明のホンシメジ由来抗菌タンパク質は、実際にピラノースオキシダーゼ活性を示し、その比活性は非常に高く、グルコースなどに対する K_m 値も低いことが判明した。またイオン交換カラムによる画分の抗菌活性の強さとピラノースオキシダーゼ活性の高さはよく一致した。よって、本発明において見出されたホンシメジ由来の抗菌タンパク質の抗菌活性は、ピラノースオキシダーゼに関連すると推定される。理論に縛られるわけではないが、本発明における抗菌活性の作用機序としては、アッセイ培地に含まれるグルコースが本酵素によって化される過程で生じる過酸化水素が病原菌に有害に働く可能性が考えられる。

【0031】

本発明のタンパク質の精製および単離は、硫安沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー（Mono Q、Q SepharoseまたはDEAEなど）などのタンパク質の精製および単離のために慣用される方法を適宜組み合わせて行うことができる。

【0032】

例えば、下記の実施例において記載するように、細粉化したホンシメジを緩衝液で抽出した後、ろ過し、その上清に硫安（硫酸アンモニウム）を好適な濃度、例えば75%飽和になるまで添加して静置することにより本発明のタンパク質を含む沈殿が得られる。この沈殿をさらに透析した後、イオン交換クロマトグラフィーにかけ、塩濃度のグラジエント（例えば、塩化ナトリウムで50 mMから1 M）で溶出し、所望のタンパク質を含む画分を回収すればよい。

【0033】

本発明はまた、本発明の抗菌タンパク質をコードする遺伝子をも提供する。遺伝子の種類は特に限定されず、天然由来のDNA、組換えDNA、化学合成DNAの何れでもよく、またゲノムDNAクローン、cDNAクローンの何れでもよい。

【0034】

本発明の遺伝子は典型的には、配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するが、これは本発明の一例を示すにすぎない下記の実施例で得られたクローンの塩基配列である。天然の遺伝子の中にはそれを生産する生物種の品種の違いや、生態型 (ecotype) の違いに起因する少数の変異やよく似たアイソザイムの存在に起因する少数の変異が存在することは当業者に周知である。従って、本発明の遺伝子は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有する遺伝子のみに限定されるわけではなく、本発明の抗菌タンパク質をコードする全ての遺伝子を包含する。

【0035】

特に、本発明によってこのタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列が開示されれば、この配列またはその一部を利用して、ハイブリダイゼーションや核酸増幅反応等の遺伝子工学の基本的手法を用いて、他の生物種から同様の生理活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を容易に単離することができる。このような場合、そのような遺伝子も本発明の範囲に含まれる。

【0036】

相同遺伝子のスクリーニングのために使用するハイブリダイゼーション条件は特に限定されないが、一般的にはストリンジェントな条件が好ましく、例えば、 $6\times\text{SSC}$ 、 $5\times\text{Denhardt's}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 25°C ないし 68°C などのハイブリダイゼーション条件を使用することが考えられる。この場合、ハイブリダイゼーションの温度としては、より好ましくは 45°C ないし 68°C （ホルムアミド無し）または 25°C ないし 50°C （ 50% ホルムアミド）を挙げることができる。ホルムアミド濃度、塩濃度及び温度などのハイブリダイゼーション条件を適宜設定することによりある一定の相同性以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAをクローニングできることは当業者に周知であり、このようにして

クローニングされた相同遺伝子は全て本発明の範囲の中に含まれる。

【0037】

核酸増幅反応は、例えば、複製連鎖反応（PCR）（サイキら、1985, Science 230, p. 1350-1354）、ライゲース連鎖反応（LCR）（ウーら、1989, Genomics 4, p. 560-569；パリンガーら、1990, Gene 89, p. 117-122；パラニーら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, p. 189-193）および転写に基づく増幅（コーら、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, p. 1173-1177）等の温度循環を必要とする反応、並びに鎖置換反応（SDA）（ウォーカーら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, p. 392-396；ウォーカーら、1992, Nuc. Acids. Res. 20, p. 1691-1696）、自己保持配列複製（3SR）（グアテリら、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, p. 1874-1878）およびQ β レプリカーゼシステム（リザイルディら、1988, BioTechnology 6, p. 1197-1202）等の恒温反応を含む。また、欧州特許第0525882号に記載されている標的核酸と変異配列の競合増幅による核酸配列に基づく増幅（Nucleic Acid Sequence Based Amplification: NASABA）反応等も利用可能である。好ましくはPCR法である。

【0038】

上記のようなハイブリダイゼーション、核酸増幅反応等を使用してクローニングされる相同遺伝子は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有する。

【0039】

本発明によればまた、ホンシメジ由来の抗菌タンパク質を得るためのオリゴヌクレオチドであって、

配列表の配列番号 1 に示す抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列から以下の条件を満たすように 2 つの領域を選択し：

- 1) 各領域の長さが 1 5 - 3 0 塩基であること；
- 2) 各領域中の G + C の割合が 4 0 - 6 0 % であること；

上記領域と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖 DNA を製造し、または、上記一本鎖 DNA によってコードされるアミノ酸残基を変化させないように遺伝子暗号の縮重を考慮した一本鎖 DNA の混合物を製造し、さらに必要であれば上記抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖 DNA を製造する

ことを含む方法により製造された当該オリゴヌクレオチドが提供される。本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば本発明の遺伝子を検出もしくは単離するためのハイブリダイゼーション、あるいは適当な 2 種をプライマー対として用いた PCR 等の増幅反応に用いることが可能である。

【 0 0 4 0 】

本発明のオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列表の配列番号 8 ~ 1 2 の何れかに記載のヌクレオチド配列を有する。このヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列に基づいて、各々のタンパク質をコードする遺伝子断片のクローニングのための PCR 用プライマーとして設計されたものであり、当該アミノ酸をコードすることが可能な全ての塩基をミックスしたプライマーである。

【 0 0 4 1 】

本発明の遺伝子の部分断片は、上記オリゴヌクレオチドの適切な組み合わせを使用してホンシメジ子実体 cDNA ライブラリーを鋳型にして PCR 等の核酸増幅反応を行うことにより増幅させて単離することができる。かくして得られた増幅産物をプローブとして使用してさらに cDNA ライブラリーをブランクハイブリダイゼーションなどでスクリーニングすることにより完全長の cDNA クローンを単離することができる。核酸増幅反応の手順及び条件、ブランクハイブリダイゼーションの条件などは当業者に周知である。

【 0 0 4 2 】

本発明によればまた、本発明の遺伝子を含む組換えベクターが提供される。プ

ラスミドなどのベクターに本発明の遺伝子のDNA断片を組み込む方法としては、例えば、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 53 (1989) に記載の方法などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えベクター（例えば、組換えプラスミド）は、宿主細胞（例えば、E-coil T B1, LE392 またはXL-1 Blue等）に導入される。

【0043】

プラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 74 (1989) に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。

【0044】

ベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（例えば、プラスミドDNAなど）に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。用いられるベクターの具体例としては、大腸菌由来のプラスミドとして、例えば、p Bluescript、pUC18、pUC19、pBR322などが例示されるがこれらに限定されない。

【0045】

所望のタンパク質を生産する目的においては、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターの種類は、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌用発現ベクターとして、pQE-30、pQE-60、pMAL-C2、pMAL-p2、pSE420などが好ましく、酵母用発現ベクターとしてpYES2（サッカロマイセス属）、pPIC3

5K、pPIC9K、pAO815（以上ピキア属）、昆虫用発現ベクターとしてpBacPAK8/9、pBK283、pVL1392、pBlueBac4.5などが好ましい。

【0046】

形質転換体は、所望の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。用いられる宿主細胞としては、本発明の発現ベクターに適合し、形質転換され得るものであれば特に制限はなく、本発明の技術分野において通常使用される天然の細胞、または人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞を用いることが可能である。例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などが挙げられる。

【0047】

宿主細胞は、大腸菌、酵母または昆虫細胞が好ましく、具体的には、大腸菌（M15、JM109、BL21等）、酵母（INVScl（サッカロマイセス属）、GS115、KM71（以上ピキア属）など）、昆虫細胞（BmN4、カイコ幼虫など）などが例示される。また、動物細胞としてはマウス由来、アフリカツメガエル由来、ラット由来、ハムスター由来、サル由来またはヒト由来の細胞若しくはそれらの細胞から樹立した培養細胞株などが例示される。さらに、植物細胞に関しては、細胞培養が可能であれば特に限定されないが、例えば、タバコ、アラビドプシス、イネ、トウモロコシ、コムギ由来の細胞などが例示される。

【0048】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター／オペレーター領域、開始コドン、所望の抗菌タンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターおよび複製可能単位から構成される。

【0049】

宿主細胞として酵母、植物細胞、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合には、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター、開始コドン、所望の抗菌タンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターを合んでいることが好

ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、選択マーカー領域または複製可能単位などを適宜含んでもよい。

【0050】

本発明のベクターにおいて、好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン（ATG）が例示される。また、終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG、TGA、TAAなど）が例示される。

【0051】

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを意味し、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたプラスミド）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coliではプラスミドpQE30、pETまたはpCALもしくはそれらの人工的修飾物（pQE30、pETまたはpCALを適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母ではプラスミドpYES2もしくはpPIC9Kが、また昆虫細胞ではプラスミドpBacPAK8/9等があげられる。

【0052】

エンハンサー配列、ターミネーター配列については、例えば、それぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

【0053】

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマイシン、ハイグロマイシンまたはスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子などが例示される。

【0054】

発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、所望の抗菌タンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、およびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。

。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素部位など）を用いることができる。

【0055】

本発明の発現ベクターの宿主細胞への導入〔形質転換（形質移入）〕は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌（*E. coli*, *Bacillus subtilis*等）の場合は、例えばCohenらの方法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110（1972）〕、プロトプラスト法〔*Mol. Gen. Genet.*, 168, 111（1979）〕やコンピテント法〔*J. Mol. Biol.*, 56, 209（1971）〕によって、*Saccharomyces cerevisiae*の場合は、例えばHinnenらの方法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1927（1978）〕やリチウム法〔*J. Bacteriol.*, 153, 163（1983）〕によって、植物細胞の場合は、例えばリーフディスク法〔*Science*, 227, 129（1985）〕、エレクトロポレーション法〔*Nature*, 319, 791（1986）〕によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法〔*Virology*, 52, 456（1973）〕、昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法〔*Mol. Cell. Biol.*, 3, 2156-2165（1983）〕によってそれぞれ形質転換することができる。

【0056】

本願発明のDNA断片を用いて病害抵抗性植物を作出する目的においては、植物形質転換用ベクターが有用である。植物用ベクターとしては、植物細胞中で当該遺伝子を発現し、当該タンパク質を生産する能力を有するものであれば特に限定されないが、例えば、pBI221、pBI121（以上Clontech社製）、及びこれらから派生したベクターが挙げられる。また、特に単子葉植物の形質転換には、pIG121Hm、pTOK233（以上Hieiら, *Plant J.*, 6, 271-282（1994））、pSB424（Komariら, *Plant J.*, 10, 165-174（1996））などが例示

される。

【0057】

形質転換植物は、上述のベクターの β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子の部位に本願発明のDNA断片を入れ替えて植物形質転換用ベクターを構築し、これを植物に導入することで調整することができる。植物形質転換用ベクターは、少なくともプロモーター、翻訳開始コドン、所望の遺伝子 (本願発明のDNA配列またはその一部)、翻訳終始コドンおよびターミネーターを含んでいることが好ましい。また、シグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、選抜マーカー領域などを適宜含んでいてもよい。

【0058】

プロモーター、ターミネーターは植物細胞で機能するものであれば特に限定されないが、構成的発現をするプロモーターとしては、上記ベクターに予め組み込まれている35Sプロモーターの他に、アクチン、ユビキチン遺伝子のプロモーターなどが例示される。しかしながら、より好適には誘導性のプロモーターを組み入れて用いてもよい。こうすることで病害虫が形質転換植物に接触した時のみ、当該タンパクが生産され、抵抗性となる。用いられるべき誘導性プロモーターとしてはフェニルアラニンアンモニアリアーゼ、キチナーゼ、グルカナーゼ、チオニン、オズモチンあるいは病害虫やストレスに反応するその他の遺伝子のプロモーターが考えられる。

【0059】

植物への遺伝子導入法としては、アグロバクテリウムを用いる方法 (Horsch et al., Science, 227, 129 (1985)、Hiei et al., Plant J., 6, 271-282 (1994))、エレクトロポレーション法 (Fromm et al., Nature, 319, 791 (1986))、PEG法 (Paszkowski et al., EMBO J., 3, 2717 (1984))、マイクロインジェクション法 (Crossway et al., Mol. Gen. Genet., 202, 179 (1986))、微小物衝突法 (McCabe et al.,

, Bio/Technology, 6, 923 (1988)) などが挙げられるが、所望の植物に遺伝子を導入する方法であれば特に限定されない。また、宿主となる植物種も本発明の植物形質転換用ベクターに適合し、形質転換されるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される植物、例えば双子葉植物ではタバコ、アラビドプシス、トマト、キュウリ、ニンジン、ダイズ、パレイショ、テンサイ、カブ、ハクサイ、ナタネ、ワタ、ペチュニアなどが挙げられ、単子葉植物では、イネ、トウモロコシ、コムギなどが挙げられる。

【0060】

本発明のタンパク質は極めて強力な抗菌活性をもつ。例えばイネのイモチ病菌に対しては 5 ng/ml という非常に低い濃度で孢子の発芽を完全に抑制する（後述の実施例 2 を参照）。この濃度においては長時間のインキュベーションの後にも孢子の発芽はみられないことから、本発明のタンパク質のイモチ病菌に対する効果は、生長の部分的阻害というよりはむしろ、殺菌効果であると考えられる。このような低い濃度（ナノグラムオーダー）で、病原菌の生育を完全に抑止できる抗菌タンパク質は本発明者の知る範囲では現在までに報告されていない。後述の実施例においては、抗菌タンパク質の精製のための抗菌アッセイのための植物病原菌としてイネの最重要病害であるイモチ病菌と紋枯病菌を使用した。同定したホンシメジ抗菌タンパク質が、これら以外の植物病害にも大差ないレベルで抗菌効果を有している可能性は極めて高い。このように本発明のホンシメジ由来の抗菌タンパク質は強い抗菌活性を有していることから、本発明のタンパク質は、抗菌剤や農薬などの薬剤としてそれが活性のある形で含まれるような製剤として利用することができる。この場合、本発明のタンパク質をコードする DNA 配列を用いれば、先述のように例えば大腸菌や酵母などで機能する発現ベクターにその DNA を組み込んで大量に製造することができる。

【0061】

本発明のタンパクは、上記の如く調整された発現ベクターを含む形質転換細胞を栄養培地で培養することによって発現（生産）することができる。栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素

源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖、メタノールなどが、例示される。無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また、所望により他の栄養素（例えば無機塩（例えば、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。培養は、当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地の pH 及び培養時間は、本発明のタンパクが大量に生産されるように適宜選択される。

【0062】

本発明のタンパクは、上記培養により得られる培養物より以下のようにして取得することができる。すなわち、本発明のタンパクが宿主細胞内に蓄積する場合には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞を集め、これを適当な緩衝液（例えば濃度が 10M~100mM 程度のトリス緩衝液、リン酸緩衝液、HEPES 緩衝液、MES 緩衝液などの緩衝液。pH は用いる緩衝液によって異なるが、pH 5.0~9.0 の範囲が望ましい）に懸濁した後、用いる宿主細胞に適した方法で細胞を破壊し、遠心分離により宿主細胞の内容物を得る。一方、本発明のタンパクが宿主細胞外に分泌される場合には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞と培地を分離し、培養ろ液を得る。宿主細胞破壊液、あるいは培養ろ液はそのまま、または硫酸沈殿と透析を行なった後に、本発明のタンパク質の精製、単離に供することができる。精製・単離の方法としては、以下の方法が挙げることができる。即ち、当該タンパクに 6×ヒスチジンや GST、マルトース結合タンパクといったタグを付けている場合には、一般に用いられるそれぞれのタグに適したアフィニティークロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。一方、そのようなタグを付けずに本発明のタンパクを生産した場合には、例えば後述する実施例に詳しく述べられている方法、即ちイオン交換クロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。また、これに加えてゲルろ過や疎水性クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィーなどを組み合わせる方法も挙げるこ

とができる。

【0063】

上記の通り本発明の抗菌タンパク質は、真菌類あるいは細菌が関与する植物の疾患の予防及び治療などに利用することが可能である。即ち、本発明によれば、本発明の抗菌タンパク質を有効成分として含む抗菌剤が提供される。本発明の抗菌剤は通常、植物の全身または局所的に、散布することができる。

【0064】

散布量は、植物の種類、生育段階、症状、散布方法、処理時間、散布するタンパク質の種類（全長のタンパク質、該タンパク質の一部を置換、欠失、挿入及び／又は付加したタンパク質など）、生育している場所の気候、生育している場所の土壌などにより異なるが、一日一回から複数回散布することができる。散布量は種々の条件により変動する。本発明の抗菌剤の散布に際しては、必要に応じて、溶液剤、懸濁剤、乳濁剤などを混合して散布することも可能である。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤として混合される。水性の希釈剤としては、例えば蒸留水、食塩水などが挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類などが挙げられる。

【0065】

このような抗菌組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤または安定化剤（例えばアルギニン、アスパラギン酸など）などの補助剤を含んでいてもよい。

【0066】

これらは、必要に応じてバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化される。これらはまた、例えば凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物の形態で製造し、使用前に無菌の蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することもできる。

【0067】

このようにして得られる抗菌剤の剤形としては、使用する用途に応じて決めれ

ばよく、上記のような添加物と混合し、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、液剤、乳剤等の形態により散布することができる。

【0068】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

【0069】

【実施例】

実施例 1 アッセイ系の構築

1) 検定系の確立

病原菌の培養：イネいもち病菌（菌株 TUS-1、レース 337；農林水産省東北農業試験場より分譲）はオートミル培地（Difco 社製，1%ショ糖添加）上で培養して分生胞子を得た。胞子液は 10%グリセロールを加えて、-80℃で保存した。

【0070】

イネ紋枯病菌（菌株 JT872）は 1/2 ジャガイモ煎汁培地（PD 培地：Difco 社製）で 2 日間培養し、5×5 mm 程度の菌糸塊を 3 個をテフロンホモジナイザーで 1/2 PD 培地とともに軽く磨砕して得られた断片化菌糸を接種源とした。

【0071】

上記の接種源を 96 穴マイクロタイタープレート（コーニング社製）に 1 ウェル当たりいもち病菌分生胞子は約 1,000 個、紋枯病菌は断片化菌糸は約 300 個になる様に 100 μl の 1/2 PD 培地とともに加え、28℃の恒温器で培養した。菌の増殖はマイクロプレートリーダー（Bio-Rad 社製 Benchmark）で 595 nm の吸光度を測定した。

【0072】

塩、緩衝液の影響：菌の増殖に対する塩や緩衝液の影響を、培地に NaCl やリン酸緩衝液、Tris 緩衝液、Hepes 緩衝液、牛血清アルブミン、ジチオスレイトールなどを一定量加えて判定した。

【0073】

2) ホンシメジからのタンパク質抽出

ホンシメジ（日本産。滋賀県森林センターより入手）10gをあらかじめハサミで細かく切断後、液体窒素を用いて凍結して乳鉢で細粉となるまで磨砕し、30mlの50mM HEPES緩衝液を加えて30分間抽出を行った。抽出液はミラクロスでろ過後、10,000×g、20分間の遠心を行った上清に硫酸を75%飽和になるように加えて、一晚4℃で静置した。再度、15,000×g、20分間の遠心で沈殿させて、沈殿物を3mlの10mM HEPES緩衝液、pH7.5に溶解し、透析チューブ（Spectra/Por1 MWCO 6-8000, Spectrum Medical Industries社製）またはベンゾイル化透析チューブ（SIGMA社製）を用いて10mM HEPES緩衝液、pH7.5に対して透析を行って、不溶物を遠心によって除去してホンシメジタンパク質試料とした。ホンシメジタンパク質試料のタンパク質濃度は牛血清アルブミン（BSA）を標準タンパク質としてBradford法で測定した。

実施例2 抗菌タンパクの精製

1) ホンシメジ粗タンパク試料の抗菌活性

いもち病菌、紋枯病菌の培養系に培養開始直後にホンシメジの粗タンパク質抽出液試料を一定量加えて、2日間まで培養して、吸光度変化を経時的に測定して抗菌性の有無について判定した。タンパク試料は希釈系列を作成し、抗菌性に対する希釈限界点を検出した。その結果、いもち・紋枯の両病原菌に対する高い抗菌活性が見いだされた（表1）。

【0074】

【表1】

表1 ホンシメジタンパク粗抽出液の抗菌活性

キノコ	抽出時 pH	完全生長阻害濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
		いもち病菌 紋がれ病菌

ホンシメジ

7. 5

30

30

いもち病菌に対する完全生長阻害濃度は、 $30 \mu\text{g}$ 全抽出タンパク/ ml 以下と概算され、このことから、ホンシメジの抽出物の中には高い抗菌活性をもつ物質が含まれていることが明らかとなった。このタンパク抽出液の菌に対する生長阻害の様式は、濃度の高い場合は発芽の完全抑制、低い場合は菌糸の生長阻害が観察された。菌糸の伸長阻害程度は、明らかに濃度依存的であった。また、いもち病菌の細胞は、その細胞質が細胞壁から離れ、原形質分離様の様相を呈した。

【0075】

2) イオン交換カラムによる精製

次に抗菌タンパク質の精製を行った。ホンシメジ 70 g を液体窒素中で粉碎し、 200 ml の緩衝液 (50 mM MES, 50 mM NaCl, $\text{pH} 6.0$) 中で 30 分間タンパクを抽出した。二重のミラクロスで濾過した後、 $15000 \times \text{g}$ で 20 分間遠心し、不純物を沈殿させた。上清を濾紙でさらに濾過し、タンパク試料とした。タンパク試料約 200 ml を、イオン交換体 Q-Sepharose FF (Pharmacia 社製) を充填したカラム (内径 $1.1 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$) にかけた。流速は 2.5 ml/分 とし、基本緩衝液は 50 mM Mes $\text{pH} 6.0$, 50 mM NaCl、溶出緩衝液は 50 mM Mes $\text{pH} 6.0$, 1 M NaCl を用い、グラジエント (NaCl で 50 mM から 1 M) は、試料を打った 100 分後から 120 分間かけた。この後さらに溶出緩衝液を 40 分間流した。画分の回収は、グラジエント開始から 40 分ごとに 4 回行った (100 ml/画分)。これら 4 種の画分 (I, II, III, IV) の希釈系列を作製して、イネいもち病菌に対する抗菌アッセイを行った。その結果、画分 II ~ IV に抗菌活性が認められた。これらの画分によって病原菌細胞には原形質分離が生じた。最も活性の高かった画分 II ($0 \sim 333 \text{ mM}$ NaCl に相当) をセントリプレップ 10 (Amicon 社製、MWCO 10,000) で濃縮し、イオン交換カラム Mono Q HR5/5 (Pharmacia 社製) にかき、抗菌タンパクを部分精製した。流速は 1 ml/分 とし、基本緩衝液は 50 mM Mes $\text{pH} 6.0$, 50 mM NaCl、溶出緩衝液は 50 mM M

es pH 6.0, 1M NaCl を用い、グラジェント (NaCl で 50 mM から 1M) は、試料を打った 20 分後から 40 分間かけた。各画分 (1 ml) の一部をイモチ病菌に対する抗菌アッセイと、SDS-PAGE 電気泳動に供試した。まず、HPLC のチャートと抗菌性の強さとの関係を図 1 に示した。抗菌性は Mono Q の各画分から 5、1、0.2 μ l をとり、イモチ病菌に対するアッセイを行い、+++ (0.2 μ l まで阻害)、++ (1 μ l まで阻害)、+ (5 μ l まで阻害)、- (5 μ l でも阻害しない) の 4 段階で表示した。その結果、A280 と、イモチ菌に対する抗菌活性によりタンパクをモニターすると、pH 6.0 においてイオン強度 (NaCl 濃度) が 250 mM 付近に抗菌タンパクの溶出ピークが現れた。その後、イオン強度が高くなるにつれ、単位溶出液あたりのタンパク質の抗菌性は徐々に減少することが明らかとなった。

【0076】

次に各画分から 10 μ l をとり、等量の 2×SDS 泳動用緩衝液 (Sambrook et al. 1989) を加え、95℃ で 5 分間処理した後、Laemmli (1970) の方法に従い、SDS-PAGE 電気泳動を行った。ゲルは 15% の PAGEL (ATTO 社製) を用い、銀染色 II キットワコー (和光純薬社製) によりタンパク質を検出した。タンパクのおよその分子量と量を見積もるため、分子量マーカー (LMW: Pharmacia LKB 社製、分子量の大きい順に 94 kDa、67 kDa、43 kDa、30 kDa、20.1 kDa、14.4 kDa) を 1 本のバンドが 20 ng となるように泳動した。電気泳動像と抗菌性の強さの関係を図 2 に示した。各レーンの上に表示した数字は、図 1 の画分の番号と同じもので、抗菌性の強さも図 1 に準じて表示した。抗菌性とリンクすると考えられるタンパクのバンドを精査すると、約 70 kDa と、約 65 kDa の 2 つのバンドが候補として挙げられた (図 2 矢印)。これら 2 種のバンドの濃度と抗菌活性の度合いは正の相関関係にあるので、これらのバンドが抗菌タンパク質本体である可能性が強く示唆された。このうち、特に 65 kDa タンパクは、Q-Sepharose による分画においても、Mono Q による分画においても、タンパクのバンドの濃度と、抗菌活性の強さとが非常によくリンクしていた。分子量マーカー (67 kDa のアルブミン) から、デンストメーター

により抗菌タンパクの量を推定し、イモチ病菌に対する完全生長阻害濃度を算出すると、およそ 5 ng/ml となった。

【0077】

3) 抗菌性タンパク質のN末アミノ酸配列の解読

上記の mono Q の画分番号 36~44 をセントリカット V-20 (クラボウ社製) で濃縮し、SDS-PAGE 電気泳動した。トリスを除去し、グリシンを含まない緩衝液系で PVDF 膜 (ミリポア社製) へ転写し、クマシーブリリアントブルー R-250 で軽く染色した後、脱色した。その後、抗菌性タンパク質であると考えられた 70 kDa と、65 kDa のタンパクバンドを切り出した。N 末端アミノ酸配列は、気相プロテインシーケンサー (HPG1005A Protein Sequencing System) を用いて、エドマン分解法により決定した。

【0078】

その結果、65 kDa タンパクからは次のような 30 アミノ酸

【0079】

【化1】

N 末端-NAEEGTAVPYVPGYHKKNEIEFQKDI DRFV-C

末端 (配列番号 3)

が決定された。

【0080】

一方、70 kDa タンパクは解読が不可能であった。この原因として、N 末端がブロックされていることが考えられた。そこで、リシルエンドペプチダーゼ、V8 プロテアーゼを用いて、70 kDa タンパク質を部分消化し、43 kDa リシルエンドペプチダーゼ消化物、45 kDa V8 プロテアーゼ消化物を得た。これらの部分消化タンパク質のアミノ酸配列を再解析した結果、前者から 24 残基

【0081】

【化2】

N 末端-EFDESIRHTLVLRSLQDAYKDRQR-C 末端 (配列番号 4)

後者から 2 9 残基

【0 0 8 2】

【化 3】

N 末端 - A E R L I G T S T K E F D E S I R H T L V L R S L Q D A Y - C 末端 (配列番号 5)

が決定された。両アミノ酸配列は大部分が重複していたので、部分分解による内部アミノ酸配列は、全体で 3 4 残基

【0 0 8 3】

【化 4】

N 末端 - A E R L I G T S T K E F D E S I R H T L V L R S L Q D A Y K D R Q R - C 末端 (配列番号 6)

が決定されたことになる。決定されたアミノ酸配列に関して、データベースサーチを行ったところ、6 5 k D a タンパクからの 3 0 アミノ酸、7 0 k D a タンパクからの 3 4 アミノ酸は、ともにカワラタケのピラノースオキシダーゼと相同性を示した。そこで、Mono Q の各画分のピラノースオキシダーゼ活性を測定した。測定法は、N i s h i m u r a e t a l (1 9 9 6) の方法に準じた。その結果、ピラノースオキシダーゼ活性の高さと、抗菌活性の強さはよく一致した。従って、抗菌性は、培地中のグルコースが本酵素によって酸化される際に生じる過酸化水素に由来すると推定された。次に、6 5 k D a と 7 0 k D a の両タンパク質のみを含む画分 (図 2 番号 4 2 ~ 4 4) を濃縮し、ピラノースオキシダーゼの諸性質を解析した。その結果、ホンシメジ由来抗菌タンパク質のピラノースオキシダーゼ活性は非常に高く、グルコースや、1, 5 - アンヒドログルシトールに対する K m 値も低いことが明らかとなった (表 2)。

【0 0 8 4】

【表 2】

表 2 ホンシメジ抗菌タンパク質のピラノースオキシダーゼ活性とその諸性質

酵素タンパク	K m (mM)	比活性 (U/mg) *
--------	----------	--------------

グルコース 1,5-アンヒドログルシトール

ホンシメジ 0.50 6.5 101.6

* 1U=1 μ mol e H_2O_2 /分 pH7.0中、37℃
酵素タンパク量 (65kDa+70kDa) は、SDS-PAGE 銀染色により
定量した。

実施例3 cDNAの単離

1) 縮重プライマーの設計

1) で決定されたアミノ酸配列を基に、考えられる全ての塩基がミックスされ
たプライマーを合成した (Tmは52~56℃、括弧内の数字は縮重度を示す)
。具体的には、65kDa タンパク由来のアミノ酸配列 (30残基) から以下の
3種のプライマーを合成した。

【0085】

【化5】

65R1 (5' -g a r g a r g g i a c i g c i g t i c c-3' (4)) (配列番号7)

65R2 (5' -g a r t t y c a r a a r g a y a t h g a y m g-3' (384)) (配列番号8)

65R3 (5' -t t y g t i a a y g t i a t h t g y g g i g c-3' (24)) (配列番号9)

一方、70kDa タンパクの部分分解物由来のアミノ酸配列 (34残基) から
も、以下の3種のプライマーを合成した。

【0086】

【化6】

70F1 (5' -t g i c k d a t i s w y t c r t c r a a y t c-3' (384)) (配列番号10)

70F2 (5' -t g i c k r t c y t t r t a i g c r t c y t g-3' (64)) (配列番号11)

70F3 (5' - ggigcraadatickytgickrtc-3' (96)) (配列番号12)

上記プライマー中、rはaまたはgを、yはcまたはtを、hはaまたはcまたはtを、mはaまたはcを、kはgまたはtを、dはaまたはgまたはtを、sはgまたはcを、wはaまたはtを、iはイノシンをそれぞれ示す。

【0087】

2) ホンシメジ子実体cDNAライブラリーの構築

ホンシメジ子実体からSDSフェノール法で全核酸を抽出し、塩化リチウム沈殿により全RNAを回収した。これからmRNA purification kit (Pharmacia社製) によりホンシメジmRNAを調製した。子実体約10gから20μgのmRNAが得られた。このうち5μgをZAP cDNA synthesis kit (Stratagene社製) に供試し、cDNAを合成した。ゲル濾過カラムにより1~5kbのcDNAを分画し、Uni-ZAP XRベクター (Stratagene社製) にライゲーションし、Gigapack III (Stratagene社製) によりパッケージングを行った。全ての手順はキット添付の説明書に従った。構築したホンシメジcDNAライブラリーのタイターは、およそ300万pfuと算出された。

【0088】

3) RT-PCRによるプローブの取得

1) で合成したプライマーを用いて2) で合成したcDNAを鋳型にPCRを行い、ライブラリーをスクリーニングするためのプローブとなるホンシメジタンパクの部分長cDNAの増幅を試みた。反応条件は以下のように行った。50μlの反応液中に、cDNA 100ng, 10×Ex taq buffer 5μl, dNTPs 4μl, primer 10pmoles/each kind of sequence, Ex taq (Takara社製) + Taq START antibody (Clontech社製) 1μlをそれぞれ含み、プログラムテンプコントロールシステムPC-700 (ASTEK社) を用いて、94℃ 3分を1回、94℃ 1分、50℃ 1分、72℃ 1分を35回、72℃ 6分を1回行った。その結果、65R1-70F1、65R1-7

0F2、65R2-70F1、65R2-70F2、65R2-70F3、65R3-70F1のプライマー組み合わせにおいて約0.4~0.5 kbの産物が増幅された。これらのうち増幅効率のより高かった65R2-70F1の組み合わせによる約0.4 kbの断片をゲル精製し、ベクターpCRII (Invitrogen社製) にクローニングし、塩基配列を決定した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、23) で決定されたアミノ酸配列の一部と同一の配列を含み、しかも配列全体に渡ってカワラタケのピラノースオキシダーゼと緩い相同性を示した。このことから、精製した70 kDaと65 kDaの抗菌タンパク質は、一つの遺伝子にコードされ、RT-PCRにより得られたcDNAクローンはホンシメジ抗菌タンパク質の部分長cDNAであることが確認された。

【0089】

4) 完全長cDNAのスクリーニング

3) で得られたクローンをベクターから切り出し、これをプローブに用いて2) で構築したホンシメジcDNAライブラリーをスクリーニングした。14×10 cmの角形シャーレにZAP cDNA synthesis kit (Stratagene社製) の説明書に従って、約15000 pfuのファージを宿主菌XL1-blue MRF' とともにプレーティングした。プラークをHybond-N+ナイロンメンブレンフィルター (Amersham社製) に接触させ、メンブレン添付の説明書に従ってアルカリ処理を行い、DNAを変性させ、メンブレン上に固定させた。ハイブリダイゼーション、および洗浄の条件は、メンブレンに添付の説明書に従って高いストリンジェンシーで行った。1次スクリーニングで約120,000 pfuのファージから20個のポジティブクローンが得られた。これらのクローンに関して、2次スクリーニング、プラークの精製を兼ねた3次スクリーニングを行い、20個全てについてZAP cDNA synthesis kit (Stratagene社製) の説明書に従って、in vivo excisionを行った。その結果、18個のクローンが、ファージミドベクターpBluescript SKに組み込まれたcDNAとして回収された。これらのクローンの長さは1.7~2.1 kbであり、制限酵素分析から非常によく似た遺伝子由来であることが示唆された。

【0090】

5) 塩基配列の決定

上記の18個のcDNAクローンについて、5' および3' 側の塩基配列およそ500bpを決定した。得られた塩基配列データをGenetyx ver. 9.0解析ソフト(Software Development社製)を用いて解析した。その結果、ポリA付加部位にはクローン間で差異があるものの、全てのクローンが23)で決定した65kDaタンパクの30アミノ酸をコードするDNA配列を含んでいた。番号13(2.1kb)のcDNAクローンが最長であったので、このクローンの全塩基配列を決定した。プライマーウォーキング法により、ABI PRISM蛍光シーケンサー(Model 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer社製)を用いて塩基配列を決定した。その結果、ホンシメジ抗菌タンパクをコードするcDNAは全長2106塩基対からなり、1854塩基対のオープンリーディングフレームを含み、618個のアミノ酸をコードしていた(配列番号1および2)。アミノ酸配列から推定される分子量は約68487、等電点は6.12と算出された。精製タンパクから決定されたアミノ酸配列は、65kDa由来30アミノ酸が、配列表配列番号2のアミノ酸番号76~105に、70kDa由来34アミノ酸が、同211~244にそれぞれ対応した。これは65kDaと70kDaタンパクが同じ一つの遺伝子にコードされていることを意味する。さらに推定糖鎖付加部位が7カ所(配列表配列番号2のアミノ酸番号154、319、360、412、558、573、583)存在していた。

【0091】

以上の結果から、クローニングしたcDNAはホンシメジ抗菌タンパクをコードする遺伝子に由来すると結論された。本発明のホンシメジ由来抗菌タンパク質のアミノ酸配列について、データベース(DDBJ)上で相同性検索(BLAST)を実施したところ、カワラタケのピラノースオキシダーゼのアミノ酸配列と全体で45%の同一性を有していた。これ以外で有意に相同性のある配列は存在していないことから、本遺伝子は新規なピラノースオキシダーゼ様タンパク質をコードする遺伝子であると考えられる。

【 0 0 9 2 】

【効果】

本発明の配列表の配列番号 2 の配列または、このうち第 1 番目から第 7 5 番目の配列を除いた全配列を含むことを特徴とするタンパク質成分を有効成分として含む製剤を作出すれば、強力な抗菌剤としての利用が期待できる。また、上記タンパク質成分を有効成分として含む試薬を作出すれば、血糖など、糖の測定に利用することが出来る。本発明の配列表の配列番号 1 の DNA 配列のうち、第 8 番目から第 1 8 6 4 番目の配列であることを特徴とする DNA 配列、または第 2 3 3 番目から第 1 8 6 4 番目の配列であることを特徴とする DNA 配列を、植物細胞の中で機能しうる適当な構成的、器官・時期特異的、あるいはストレスや病害虫で誘導されるプロモーター配列と、植物細胞で機能しうるターミネター配列の発現カセットに組み込み、植物細胞に導入、再生個体を得ることにより、病害虫抵抗性植物を作出することが期待される。あるいはまた、上記の DNA 配列を大腸菌や酵母あるいは昆虫やある種の動物細胞に、それぞれの宿主で増幅可能な発現ベクターを用いて導入、発現させることにより、当該タンパクを大量に安価に得ることができると期待される。

【 0 0 9 3 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN TOBACCO INC. and NORINSUISAN-SENTANGIJYUTU SANGYOUSHIKOU CENTOR

<120> A novel protein, a gene coding therefor and a method of using the same

<130> 991703

<160> 12

<210> 1

<211> 2106

<212> DNA

<213> *Lyophyllum shimeji*

<220>

<221> CDS

<222> (8)...(1861)

<400> 1

```

atcagcc atg tct ctc tca acc gag cag atg cta cgc gac tat cca cgg      49
      Met Ser Leu Ser Thr Glu Gln Met Leu Arg Asp Tyr Pro Arg
            1             5             10

tct atg caa atc aac gga cag att cct aag aac gca att cac gaa aca      97
Ser Met Gln Ile Asn Gly Gln Ile Pro Lys Asn Ala Ile His Glu Thr
      15             20             25             30

tac gga aac gac gga gtt gat gta ttc att gca gga tct gga ccc att     145
Tyr Gly Asn Asp Gly Val Asp Val Phe Ile Ala Gly Ser Gly Pro Ile
            35             40             45

gga gcg acg tat gca aag ctc tgt gtt gaa gct ggt cta cgt gtt gtg     193
Gly Ala Thr Tyr Ala Lys Leu Cys Val Glu Ala Gly Leu Arg Val Val
            50             55             60

atg gtc gag atc gga gct gct gat agc ttc tac gct gtt aat gcc gaa     241
Met Val Glu Ile Gly Ala Ala Asp Ser Phe Tyr Ala Val Asn Ala Glu
            65             70             75

gaa gga act gca gtt ccc tac gtt cct ggc tac cac aag aag aat gaa     289
Glu Gly Thr Ala Val Pro Tyr Val Pro Gly Tyr His Lys Lys Asn Glu
            80             85             90

atc gag ttc cag aaa gat att gac cgc ttc gtc aat gta atc aag gga     337

```


Ile	Glu	Phe	Gln	Lys	Asp	Ile	Asp	Arg	Phe	Val	Asn	Val	Ile	Lys	Gly	
95					100					105					110	
gcc	tta	caa	caa	gtc	tct	gtt	cct	gtc	aga	aac	cag	aac	gtg	cct	aca	385
Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Ser	Val	Pro	Val	Arg	Asn	Gln	Asn	Val	Pro	Thr	
				115					120					125		
ctt	gat	ccc	gga	gcc	tgg	agc	gcg	ccc	cct	gga	agt	tca	gcc	ata	tcg	433
Leu	Asp	Pro	Gly	Ala	Trp	Ser	Ala	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ile	Ser	
		130					135					140				
aac	ggt	aaa	aat	cct	cac	cag	cgg	gaa	ttc	gag	aac	ttg	tct	gcg	gag	481
Asn	Gly	Lys	Asn	Pro	His	Gln	Arg	Glu	Phe	Glu	Asn	Leu	Ser	Ala	Glu	
	145					150				155						
gcc	gta	acg	cgt	gga	gtc	ggc	ggc	atg	agt	acc	cac	tgg	acg	tgc	tcc	529
Ala	Val	Thr	Arg	Gly	Val	Gly	Gly	Met	Ser	Thr	His	Trp	Thr	Cys	Ser	
160					165				170							
acg	cca	cgg	att	cat	cca	ccc	atg	gaa	agt	ctc	ccg	ggc	atc	ggc	cgt	577
Thr	Pro	Arg	Ile	His	Pro	Pro	Met	Glu	Ser	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Arg	
175				180				185					190			
ccg	aag	ctc	agt	aac	gac	ccg	gca	gag	gac	gac	aaa	gag	tgg	aac	gag	625
Pro	Lys	Leu	Ser	Asn	Asp	Pro	Ala	Glu	Asp	Asp	Lys	Glu	Trp	Asn	Glu	
			195				200				205					
ctt	tat	tcc	gag	gcc	gag	cgt	ctc	atc	ggg	act	tcc	acc	aag	gaa	ttc	673
Leu	Tyr	Ser	Glu	Ala	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Thr	Ser	Thr	Lys	Glu	Phe	
	210					215				220						
gac	gag	tca	att	cgg	cac	acc	ctt	gtt	ctg	cgc	tct	ttg	caa	gac	gcg	721
Asp	Glu	Ser	Ile	Arg	His	Thr	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Ala	
	225					230				235						
tac	aag	gat	cgt	caa	cgt	atc	ttt	cgc	cct	ctc	ccg	ttg	gca	tgc	cac	769
Tyr	Lys	Asp	Arg	Gln	Arg	Ile	Phe	Arg	Pro	Leu	Pro	Leu	Ala	Cys	His	
240					245					250						

cgg ttg aag aac gcg ccg gaa tac gtc gaa tgg cac tca gca gaa aat	817
Arg Leu Lys Asn Ala Pro Glu Tyr Val Glu Trp His Ser Ala Glu Asn	
255 260 265 270	
ctt ttc cac tct atc tac aac gat gac aag cag aag aag ctc ttt acc	865
Leu Phe His Ser Ile Tyr Asn Asp Asp Lys Gln Lys Lys Leu Phe Thr	
275 280 285	
ctg ctg acg aac cat cgc tgc aca cga ctg gcg ctt acg ggc ggg tat	913
Leu Leu Thr Asn His Arg Cys Thr Arg Leu Ala Leu Thr Gly Gly Tyr	
290 295 300	
gag aag aag att ggc gct gcc gag gtc agg aat cta ctg gcc acc agg	961
Glu Lys Lys Ile Gly Ala Ala Glu Val Arg Asn Leu Leu Ala Thr Arg	
305 310 315	
aat cct agt tcg cag ctg gac agc tat atc atg gcg aag gta tat gta	1009
Asn Pro Ser Ser Gln Leu Asp Ser Tyr Ile Met Ala Lys Val Tyr Val	
320 325 330	
ctg gcg tcg gga gcg atc ggc aac cca cag att ctc tat aac tcg ggc	1057
Leu Ala Ser Gly Ala Ile Gly Asn Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Ser Gly	
335 340 345 350	
ttc tct ggg cta cag gtc acg cca cgc aat gac tcg ttg atc ccc aac	1105
Phe Ser Gly Leu Gln Val Thr Pro Arg Asn Asp Ser Leu Ile Pro Asn	
355 360 365	
ctg ggg agg tac atc acg gag cag ccg atg gca ttt tgc cag ata gtc	1153
Leu Gly Arg Tyr Ile Thr Glu Gln Pro Met Ala Phe Cys Gln Ile Val	
370 375 380	
ttg agg cag gaa ttc gtc gac agc gtg cgc gac gat cct tat gga ctg	1201
Leu Arg Gln Glu Phe Val Asp Ser Val Arg Asp Asp Pro Tyr Gly Leu	
385 390 395	
cca tgg tgg aaa gaa gcc gtt gct caa cat att gcc aag aac ccg aca	1249
Pro Trp Trp Lys Glu Ala Val Ala Gln His Ile Ala Lys Asn Pro Thr	

400	405	410	
gat gca ctg ccc att ccg ttc cgc gat ccg gaa ccc cag gta aca acc 1297			
Asp Ala Leu Pro Ile Pro Phe Arg Asp Pro Glu Pro Gln Val Thr Thr			
415	420	425	430
cca ttt aca gaa gaa cac ccc tgg cac acg cag att cac cgc gat gct 1345			
Pro Phe Thr Glu Glu His Pro Trp His Thr Gln Ile His Arg Asp Ala			
	435	440	445
ttt tcg tac ggt gcc gtc ggt cct gag gtg gac tct cgt gtc atc gtc 1393			
Phe Ser Tyr Gly Ala Val Gly Pro Glu Val Asp Ser Arg Val Ile Val			
	450	455	460
gac ctg cgc tgg ttt ggc gca acc gac cct gaa gca aac aac ctt ttg 1441			
Asp Leu Arg Trp Phe Gly Ala Thr Asp Pro Glu Ala Asn Asn Leu Leu			
	465	470	475
gtt ttc cag aac gat gtt caa gac ggg tac agt atg ccg cag ccg acg 1489			
Val Phe Gln Asn Asp Val Gln Asp Gly Tyr Ser Met Pro Gln Pro Thr			
480	485	490	
ttc aga tat cga ccc agc act gcg tca aac gtg aga gca agg aaa atg 1537			
Phe Arg Tyr Arg Pro Ser Thr Ala Ser Asn Val Arg Ala Arg Lys Met			
495	500	505	510
atg gcc gat atg tgc gaa gtg gcg agc aac ttg gga ggt tat ttg ccc 1585			
Met Ala Asp Met Cys Glu Val Ala Ser Asn Leu Gly Gly Tyr Leu Pro			
	515	520	525
acg tcc ccc ccg cag ttt atg gat cca ggc ctt gca ctt cat ctt gcg 1633			
Thr Ser Pro Pro Gln Phe Met Asp Pro Gly Leu Ala Leu His Leu Ala			
	530	535	540
ggg act act cgc att ggc ttc gac aag gca act aca gtg gct gat aac 1681			
Gly Thr Thr Arg Ile Gly Phe Asp Lys Ala Thr Thr Val Ala Asp Asn			
	545	550	555
aac tcg ctg gtc tgg gac ttt gcc aat ctt tat gtt gca ggc aat ggc 1729			

Asn Ser Leu Val Trp Asp Phe Ala Asn Leu Tyr Val Ala Gly Asn Gly

560

565

570

acc atc agg acg ggc ttc ggc gag aac ccg aca ctt acg tcg atg tgc 1777

Thr Ile Arg Thr Gly Phe Gly Glu Asn Pro Thr Leu Thr Ser Met Cys

575

580

585

590

cac gct atc aag agc gcg agg agc atc atc aat aca ctc aag ggt ggg 1825

His Ala Ile Lys Ser Ala Arg Ser Ile Ile Asn Thr Leu Lys Gly Gly

595

600

605

act gac gga aaa aat aca ggc gag cat cgc aac ctt tga ggaaggagca ac 1876

Thr Asp Gly Lys Asn Thr Gly Glu His Arg Asn Leu

610

615

agcagtgtaa acaaacgcgt caagtggcta cttcaagttg aatgcattct ggtcccctac 1936

catgttgatg tgtacgatag gcgttgaaag attttgtgta ttactgaacc tgtactttgt 1996

ctgaatagtt atggcactat gattcatgtt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2056

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2106

<210> 2

<211> 618

<212> PRT

<213> *Lyophyllum shimeji*

<400> 2

Met Ser Leu Ser Thr Glu Gln Met Leu Arg Asp Tyr Pro Arg Ser

1

5

10

15

Met Gln Ile Asn Gly Gln Ile Pro Lys Asn Ala Ile His Glu Thr

20

25

30

Tyr Gly Asn Asp Gly Val Asp Val Phe Ile Ala Gly Ser Gly Pro

35

40

45

Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Lys Leu Cys Val Glu Ala Gly Leu Arg

50	55	60
Val Val Met Val Glu Ile Gly Ala Ala Asp Ser Phe Tyr Ala Val		
65	70	75
Asn Ala Glu Glu Gly Thr Ala Val Pro Tyr Val Pro Gly Tyr His		
80	85	90
Lys Lys Asn Glu Ile Glu Phe Gln Lys Asp Ile Asp Arg Phe Val		
95	100	105
Asn Val Ile Lys Gly Ala Leu Gln Gln Val Ser Val Pro Val Arg		
110	115	120
Asn Gln Asn Val Pro Thr Leu Asp Pro Gly Ala Trp Ser Ala Pro		
125	130	135
Pro Gly Ser Ser Ala Ile Ser Asn Gly Lys Asn Pro His Gln Arg		
140	145	150
Glu Phe Glu Asn Leu Ser Ala Glu Ala Val Thr Arg Gly Val Gly		
155	160	165
Gly Met Ser Thr His Trp Thr Cys Ser Thr Pro Arg Ile His Pro		
170	175	180
Pro Met Glu Ser Leu Pro Gly Ile Gly Arg Pro Lys Leu Ser Asn		
185	190	195
Asp Pro Ala Glu Asp Asp Lys Glu Trp Asn Glu Leu Tyr Ser Glu		
200	205	210
Ala Glu Arg Leu Ile Gly Thr Ser Thr Lys Glu Phe Asp Glu Ser		
215	220	225
Ile Arg His Thr Leu Val Leu Arg Ser Leu Gln Asp Ala Tyr Lys		
230	235	240
Asp Arg Gln Arg Ile Phe Arg Pro Leu Pro Leu Ala Cys His Arg		
245	250	255
Leu Lys Asn Ala Pro Glu Tyr Val Glu Trp His Ser Ala Glu Asn		
260	265	270

Leu Phe His Ser Ile Tyr Asn Asp Asp Lys Gln Lys Lys Leu Phe	275	280	285
Thr Leu Leu Thr Asn His Arg Cys Thr Arg Leu Ala Leu Thr Gly	290	295	300
Gly Tyr Glu Lys Lys Ile Gly Ala Ala Glu Val Arg Asn Leu Leu	305	310	315
Ala Thr Arg Asn Pro Ser Ser Gln Leu Asp Ser Tyr Ile Met Ala	320	325	330
Lys Val Tyr Val Leu Ala Ser Gly Ala Ile Gly Asn Pro Gln Ile	335	340	345
Leu Tyr Asn Ser Gly Phe Ser Gly Leu Gln Val Thr Pro Arg Asn	350	355	360
Asp Ser Leu Ile Pro Asn Leu Gly Arg Tyr Ile Thr Glu Gln Pro	365	370	375
Met Ala Phe Cys Gln Ile Val Leu Arg Gln Glu Phe Val Asp Ser	380	385	390
Val Arg Asp Asp Pro Tyr Gly Leu Pro Trp Trp Lys Glu Ala Val	395	400	405
Ala Gln His Ile Ala Lys Asn Pro Thr Asp Ala Leu Pro Ile Pro	410	415	420
Phe Arg Asp Pro Glu Pro Gln Val Thr Thr Pro Phe Thr Glu Glu	425	430	435
His Pro Trp His Thr Gln Ile His Arg Asp Ala Phe Ser Tyr Gly	440	445	450
Ala Val Gly Pro Glu Val Asp Ser Arg Val Ile Val Asp Leu Arg	455	460	465
Trp Phe Gly Ala Thr Asp Pro Glu Ala Asn Asn Leu Leu Val Phe	470	475	480
Gln Asn Asp Val Gln Asp Gly Tyr Ser Met Pro Gln Pro Thr Phe			

485	490	495
Arg Tyr Arg Pro Ser Thr Ala Ser Asn Val Arg Ala Arg Lys Met		
500	505	510
Met Ala Asp Met Cys Glu Val Ala Ser Asn Leu Gly Gly Tyr Leu		
515	520	525
Pro Thr Ser Pro Pro Gln Phe Met Asp Pro Gly Leu Ala Leu His		
530	535	540
Leu Ala Gly Thr Thr Arg Ile Gly Phe Asp Lys Ala Thr Thr Val		
545	550	555
Ala Asp Asn Asn Ser Leu Val Trp Asp Phe Ala Asn Leu Tyr Val		
560	565	570
Ala Gly Asn Gly Thr Ile Arg Thr Gly Phe Gly Glu Asn Pro Thr		
575	580	585
Leu Thr Ser Met Cys His Ala Ile Lys Ser Ala Arg Ser Ile Ile		
590	595	600
Asn Thr Leu Lys Gly Gly Thr Asp Gly Lys Asn Thr Gly Glu His		
605	610	615
Arg Asn Leu		
618		

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> *Lyophyllum shimeji*

<400> 3

Asn Ala Glu Glu Gly Thr Ala Val Pro Tyr Val Pro Gly Tyr His
1 5 10 15
Lys Lys Asn Glu Ile Glu Phe Gln Lys Asp Ile Asp Arg Phe Val

20

25

30

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> *Lyophyllum shimeji*

<400> 4

Glu Phe Asp Glu Ser Ile Arg His Thr Leu Val Leu Arg Ser Leu

1

5

10

15

Gln Asp Ala Tyr Lys Asp Arg Gln Arg

20

24

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> *Lyophyllum shimeji*

<400> 5

Ala Glu Arg Leu Ile Gly Thr Ser Thr Lys Glu Phe Asp Glu Ser

1

5

10

15

Ile Arg His Thr Leu Val Leu Arg Ser Leu Gln Asp Ala Tyr

20

25

29

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> *Lyophyllum shimeji*

<400> 6

Ala Glu Arg Leu Ile Gly Thr Ser Thr Lys Glu Phe Asp Glu Ser

1

5

10

15

Ile Arg His Thr Leu Val Leu Arg Ser Leu Gln Asp Ala Tyr Lys

20

25

30

Asp Arg Gln Arg

34

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> 9, 12, 15 and 18

<223> i represents inosine

<400> 7

gargarggia cigcigticc 20

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

garttycara argayathga ymg 23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> 6, 12 and 21

<223> i represents inosine

<400> 9

ttygtiaayg tiathtgygg igc 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> 3 and 9

<223> i represents inosine

<400> 10

tgickdatis wytcrtcraa ytc 23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> 3 and 15

<223> i represents inosine

<400> 11

tgickrtcyt trtaigrtc ytg 23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> 3, 12 and 18

<223> i represents inosine

<400> 12

ggigcraada tickytgick rtc 23

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、M o n o Q カラムによるホンシメジタンパク質の分離のチャートと抗菌性との関係を示す。

【図 2】

図 2 は、M o n o Q カラムによるホンシメジ抗菌タンパク質の分離の電気泳動像と抗菌性との関係を示す。レーン上の番号は図 1 の画分番号に一致し、M は分子量マーカーを示す。またレーン下の記号（－、＋、＋＋、＋＋＋）は抗菌活性の強さを示す。抗菌タンパク（70 kDa と 65 kDa）を矢印で示した。

【書類名】 図面

【図 1】

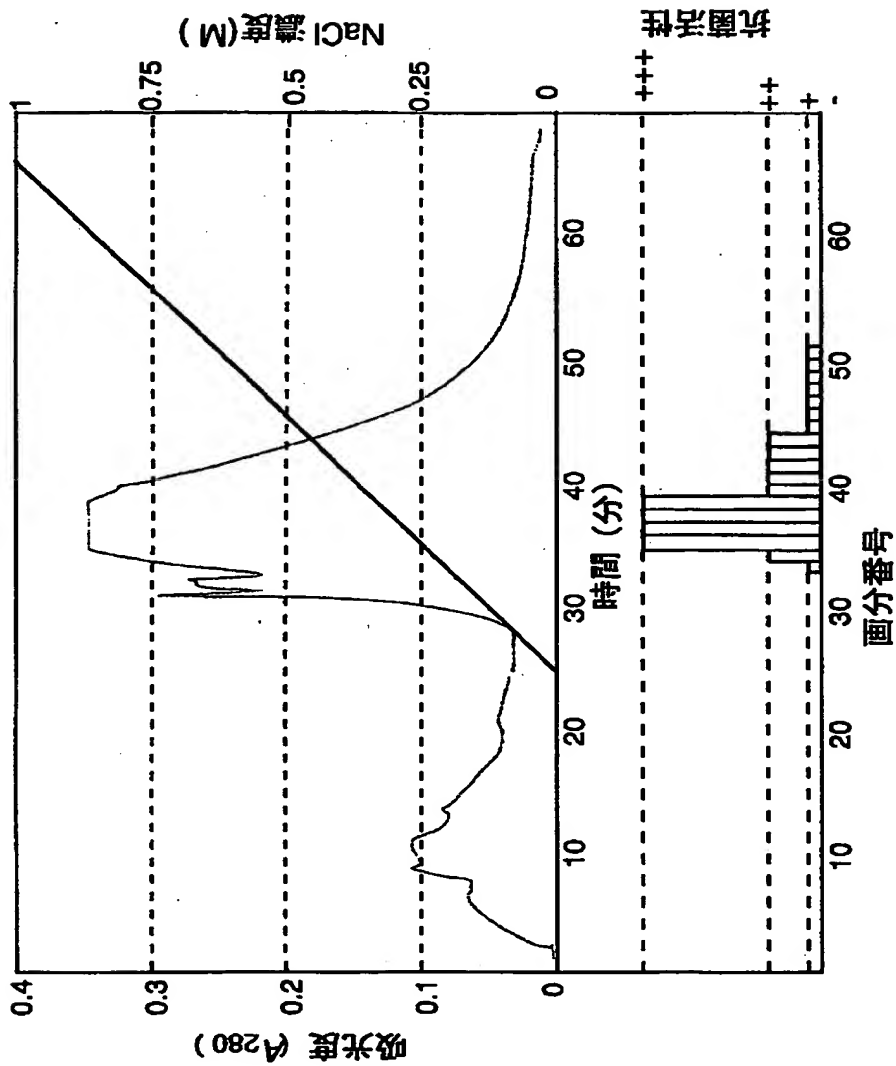
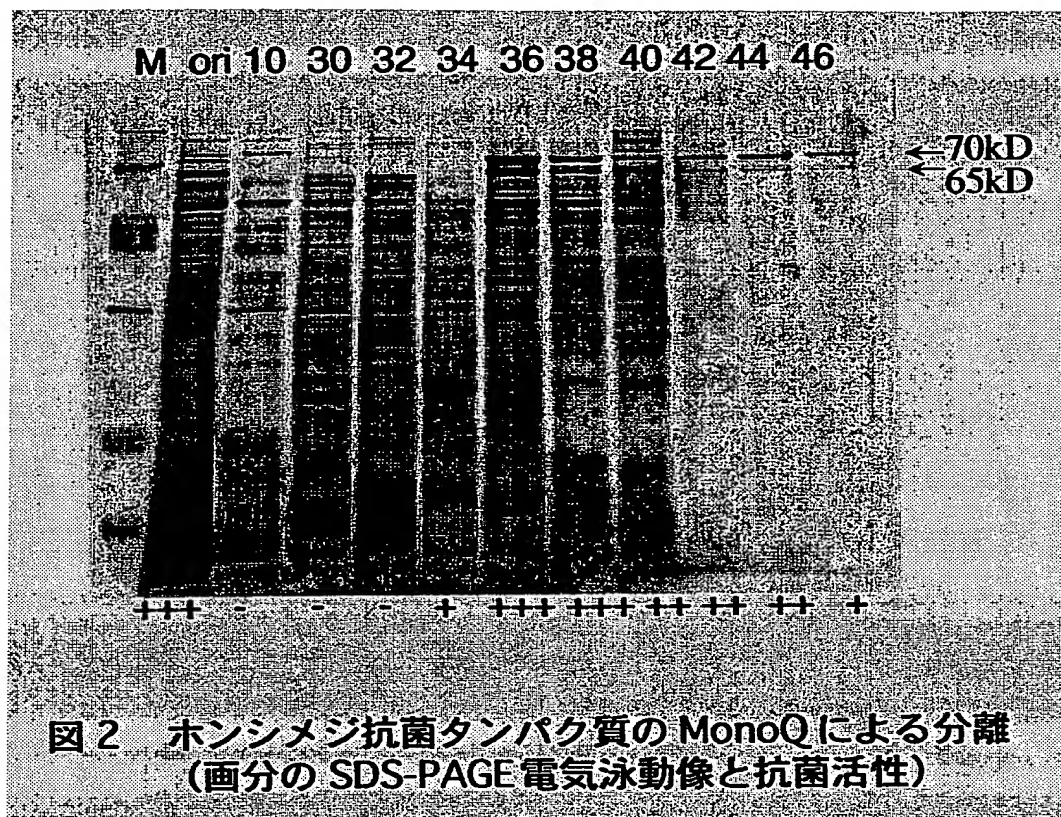


図 1 ホンシメジ抗菌タンパク質のMono Qによる分離のチャートと抗菌活性

【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、比較的低濃度でイネの２大病害であるイモチ病菌や紋枯病菌などの植物病原菌の生長を抑止できる新規な抗菌タンパク質を検索、同定し、さらに当該タンパク質の遺伝子をクローニングすることを目的とする。

【解決手段】 本発明によれば、ホンシメジの水性抽出液から硫酸沈殿法で沈殿する画分から得ることができ、少なくともイネ紋枯病菌またはイネイモチ病菌に対する抗菌活性を有し、SDS-PAGE法で分子量が約70kDaおよび／または約65kDaの成分の存在を示す、抗菌タンパク質、および当該タンパク質をコードする遺伝子並びにそれらの利用法が提供される。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成11年10月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第267238号

【補正をする者】

【識別番号】 593027587

【氏名又は名称】 社団法人農林水産先端技術産業振興センター

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2
06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 委任状

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 委任状 1

29919800034



委任状

平成 11 年 10 月 12 日

私（私ども）は、

識別番号 100089705 弁理士 社本 一夫氏、
識別番号 100071124 弁理士 今井 庄亮氏、
識別番号 100076691 弁理士 増井 忠武氏、
識別番号 100075236 弁理士 栗田 忠彦氏、
識別番号 100075270 弁理士 小林 泰氏、
識別番号 100107386 弁理士 泉谷 玲子氏、

を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 特許出願に関する手続

1. 上記出願に基づく特許法第 41 条第 1 項又は実用新案法第 8 条第 1 項の規定による優先権の主張及びその取下げ

1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ

1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求

1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求

1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄

1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録に対する登録異議の申立てに関する手続

1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する手続

1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求

1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続

1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ

1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと

1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住 所 〒100-0002 東京都港区赤坂1-4-13

名 称 社団法人

農林水産先端技術産業振興センター

代表者

理事長 畑 中 孝 晴



認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第267238号
受付番号	29919800034
書類名	手続補正書
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成11年12月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
---------	-----------------	---

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 4 5 6 9]

1. 変更年月日	1 9 9 5 年 5 月 1 6 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都港区虎ノ門二丁目 2 番 1 号
氏 名	日本たばこ産業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [593027587]

1. 変更年月日	1993年 1月14日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都港区赤坂1丁目9番13号
氏 名	社団法人農林水産先端技術産業振興センター

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)